

Bestimmung von Oxocarbonsäuren im Urin

Von H.-CH. CURTIUS, A. NIEDERWIESER und U. REDWEIK

*Aus der Medizinisch-Chemischen Abteilung der Universitäts-Kinderklinik Zürich
(Direktor: Prof. Dr. A. Prader)*

(Eingegangen am 7. Dezember 1971/26. April 1972)

Es wird eine Methode zur quantitativen Bestimmung von Oxosäuren im Urin beschrieben. Die Oxosäuren werden zunächst bei einem pH von 2,5 bis 3 in ihre 2,4-Dinitrophenylhydrazone umgewandelt, diese anschließend mit H_2/PtO_2 in Äthanol zu den entsprechenden Aminosäuren reduziert und mit Hilfe des automatischen Aminosäuren-Analysators nach STEIN und MOORE bestimmt. Die Ausbeute von 11 dem Urin zugemischten Oxosäuren wurde bestimmt. Die Brauchbarkeit der Methode wird am Beispiel eines Normalurins, dem Urin eines Patienten mit Phenylketonurie und eines Patienten mit Leucinoase (Verzweigtketten-Oxoacidurie) illustriert.

Determination of urinary keto acids

A method for the quantitative determination of urinary keto acids is described. The keto acids are converted into their 2,4-dinitrophenylhydrazones at pH 2.5 to 3, reduced to their corresponding amino acids by means of H_2/PtO_2 in ethanol and quantitatively determined according to STEIN and MOORE. The recovery of 11 keto acids was measured. The results obtained with this method are presented for a normal subject, a patient with phenylketonuria and a patient with leucinosia (branched-chain oxoaciduria).

Die 2-Oxosäuren spielen eine bedeutende Rolle im Aminosäure- und Fettsäure-Stoffwechsel. Die Analyse der Oxosäuren im Urin ist daher von großem biochemischen und medizinischen Interesse; bei gewissen angeborenen Stoffwechselkrankheiten wie Phenylketonurie, Leucinoase und Histidinämie ist die Ausscheidung einiger dieser Säuren massiv erhöht. Ihre spezifische und quantitative Bestimmung ist für die Diagnose dieser Krankheiten von großer Bedeutung. Die spezifische Analyse der Oxosäuren stellt ein komplexes Problem dar. Im Urin sind eine Vielzahl von organischen Säuren nachweisbar, zudem sind die Oxosäuren teilweise wasserlöslich und instabil. Die bis heute üblichen Methoden beruhen entweder auf der papier- oder dünnschichtchromatographischen Trennung der 2,4-Dinitrophenylhydrazone (1—4), der Gaschromatographie der Methoximtrimethylsilyläther (5) oder der Chinoxalone (6). KESNER und Mitarbeiter (7) beschrieben die Trennung der Krebszyklus-Säuren auf Silicagel.

Die meist verwendeten papier- und dünnschichtchromatographischen Methoden der 2,4-Dinitrophenylhydrazone sind allerdings nur sehr beschränkt brauchbar. Abgesehen von der Bildung von jeweils zwei Stereoisomeren sind die Dinitrophenylhydrazin-Derivate der Oxosäuren äußerst labil und können nur bei 4° unzersetzt chromatographiert werden. Eine saubere Trennung gelingt nur bei Testsubstanzen (8). Die Gaschromatographie dieser Verbindungen ist ebenfalls nur beschränkt anwendbar, da die Extraktion der teilweise sehr stark wasserlöslichen Substanzen problematisch ist. Die Kolonnenchromatographie an Kieselgel,

wie sie von KESNER beschrieben wurde, ergibt in biologischem Material keine vollständige Auftrennung. TOWERS, THOMPSON und STEWARD haben schon 1954 eine Methode zur katalytischen Hydrierung der 2,4-Dinitrophenylhydrazone zu den entsprechenden Aminosäuren beschrieben (9). Diese Methode wurde 1956 von MEISTER und ABENDSCHEIN nochmals verbessert (10). Die Hydrierung wurde in neutralem Milieu in wässriger Lösung durchgeführt und die Aminosäuren mittels Papierchromatographie bestimmt. Die an sich sehr elegante Technik fand allerdings keine weite Verbreitung, da nur geringe und variable Ausbeuten erzielt werden konnten. Außerdem erfolgte der Nachweis der entstandenen Aminosäuren meist nur semiquantitativ mittels Papier- und Dünnschichtchromatographie. Auch die elektrolytische Hydrierung, wie sie von SMITH (11) vorgeschlagen wurde, brachte keine befriedigenden Resultate.

Wir sind bei unseren Untersuchungen von der Methode von TOWERS und Mitarbeitern (9) ausgegangen und sind dabei wie folgt verfahren:

1. Hydrazonbildung — Durchführung vergleichender Untersuchungen bei verschiedenen pH-Werten, Temperaturen und 2,4-Dinitrophenylhydrazon-Konzentrationen sowie mit verschiedenen Phenylhydrazinen
2. Hydrierung — Test der Hydrierungsbedingungen bei verschiedenen pH-Werten, Temperaturen und Lösungsmitteln
3. Analyse — Bestimmung der entstehenden Aminosäuren mittels Kolonnen-Chromatographie nach STEIN und MOORE.

Material und Methoden

Geräte

Aminosäuren-Analysator Bio-Cal Modell „Biochrom BC-200“;
Hydrierungsapparatur (siehe Abb. 1).

Chemikalien

Referenz-Oxosäuren: Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo. (USA); 2,4-Dinitrophenylhydrazin: Fluka AG, Buchs (Schweiz).
Platinoxid: Fluka AG, Buchs (Schweiz).
Wasserstoff reinst: SWWL, Luzern (Schweiz).

Lösungsmittel

Fluka AG, Buchs (Schweiz) und Merck AG, Darmstadt (BRD).
Sämtliche Lösungsmittel waren von p. a. Qualität oder wurden vor Gebrauch destilliert.

Reagenzien

Testlösung: Je 100 mg folgender Säuren als Natriumsalz: Brenztraubensäure, Phenyl-brenztraubensäure, *p*-Hydroxy-phenylbrenztraubensäure, 2-Oxo-glutarsäure, 2-Oxo-bernsteinsäure, 2-Oxo-*n*-capronsäure, 2-Oxoisocapronsäure, 2-Oxo-3-methylvaleriansäure, 2-Oxo-isovaleriansäure, 2-Oxo-buttersäure und Glyoxylsäure in dest. Wasser ad 100 ml (bei 4° aufbewahren).

Gesättigte Lösung von 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 5N HCl; 0,2N Citratpuffer (pH 2,2) zum Beschicken des Aminosäuren-Analysators.

Sammeln des 24-Stdn.-Urins

Bei 4° unter Hinzufügen von etwas Chloroform (sofort aufarbeiten).

Arbeitsvorschrift

Phenylhydrazon-Bildung: 10 bis 50 ml Urin werden mit 2 bis 10 ml einer gesättigten 2,4-Dinitrophenylhydrazon-Lösung in 5N HCl versetzt; das pH soll zwischen 2,5 und 3 liegen. Anschließend wird 10 bis 15 Stdn. bei 4° im Dunkeln inkubiert. Die gelb gefärbten Hydrazone fallen in wäßr. Medium als schwer lösliche Verbindungen aus. Da ein beträchtlicher Teil der Substanzen in Lösung bleibt, empfiehlt es sich, nicht abzuzentrifugieren. Die Lösung wird deshalb mit je 20 ml eines Essigsäureäthylester-Äther Gemisches (1:1 v/v) mehrmals extrahiert, bis das Extraktionsmittel farblos bleibt. Sollten sich bei der Extraktion Suspensionen bilden, so erreicht man eine bessere Trennung der Phasen durch Zugabe von etwas Äther oder Essigsäureäthylester. Die vereinigten Extrakte werden im Rotationsverdampfer eingedampft, wobei das Wasserbad eine Temperatur von 30° nicht übersteigen soll. Dem fast zur Trockene eingedampften Präparat fügt man etwas Äthanol zu, um mitgeführtes Wasser azeotrop zu entfernen.

Präparative Darstellung der 2,4-Dinitrophenylhydrazone von *p*-Hydroxyphenylbrenztraubensäure, Brenztraubensäure und 2-Oxoglutar-säure: Die Phenylhydrazone wurden aus den Testsubstanzen nach obiger Vorschrift synthetisiert und mittels Elementaranalyse und Massenspektrometrie charakterisiert.

Hydrierung: Der Rückstand wird in 5 ml Äthanol aufgenommen und die Lösung mit einigen µl NaOH auf einen pH-Wert von 6,5 bis 7,5 gebracht. 1 bis 4 ml der auf 5 bis 10° temperierten Lösung werden mit 5 mg PtO₂ versetzt, mit Äthanol auf 6 ml aufgefüllt und in einem Schliffröhrchen von 1 cm Durchmesser und 10 cm Länge so lange hydriert, bis die gelbe Farbe über dunkelgelb nach hellgelb und schließlich nach farblos umschlägt. Die Entfärbung erfolgt je nach Konzentration der Phenylhydrazone in 20 bis 30 Min. Zur Hydrierung wurde die in Abbildung 1 dargestellte Apparatur verwendet.

Der Wasserstoff wird in einem Schliffrohr von 1 cm Durchmesser und 10 cm Länge durch die zu hydrierende Lösung geleitet (Verdampfungskälte bewirkt Abkühlung auf 5 bis 10°). Nach beendeter Hydrierung wird der Katalysator abzentrifugiert und die Lösung in Rotations-Verdampfer eingedampft.

Quantitative Aminosäuren-Analyse: Der Rückstand wird in einem Puffer von pH 2,2 gelöst und auf die sauer-neutrale Säule des Aminosäuren-Analysators aufgebracht. Die Säule wird vorher wie

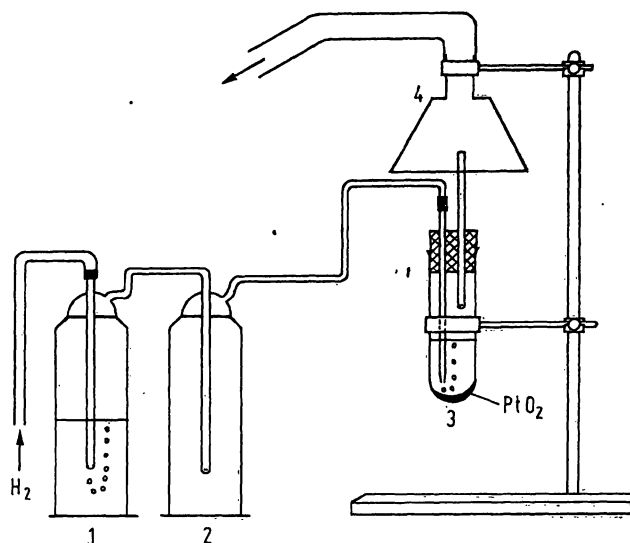


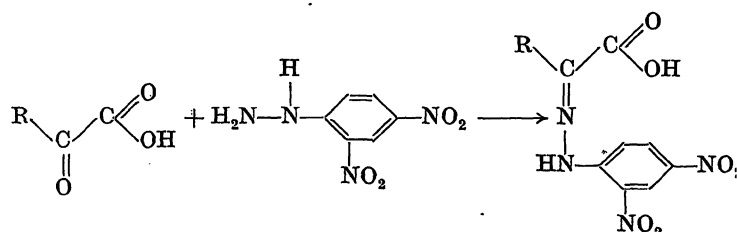
Abb. 1

Hydrierungsapparatur
1 = Waschflasche mit H₂SO₄, 2 = leere Waschflasche, 3 = Reaktionsgefäß, 4 = Absaugvorrichtung (zur Wasserstrahlpumpe)

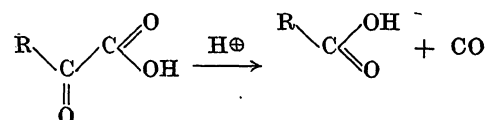
folgt präpariert: Am oberen Ende des Ionenaustauscherharzes wird zunächst eine Teflonfritte angebracht, die mit Dowex 50 X 8 100 bis 200 mesh Kationenaustauscher 2 cm hoch überschichtet wird. Vor dem Auftragen der zu untersuchenden Aminosäure-Lösung wird die gesamte Kolonne mit 0,2N NaOH gewaschen und mit Puffer pH 3,25 äquilibriert. Nach Beendigung der Analyse, vor der Regeneration mit 1N NaOH, saugt man die aufgetragene Harzschicht über der Teflonfritte ab, um eine Kontamination des teuren Aminosäure-Harzes mit Spaltprodukten (Farbstoffen) zu vermeiden.

Resultate

Beim Vergleich verschiedener Derivate (Phenylhydrazone, *p*-Nitrophenylhydrazone und 2,4-Dinitrophenylhydrazone) ergab sich für die 2,4-Dinitrophenylhydrazone die beste Ausbeute. Die Phenylhydrazonbildung erfolgt nach folgender Formel:



Als Konkurrenzreaktion kann in saurer Lösung nach folgendem Schema Decarboxylierung eintreten:



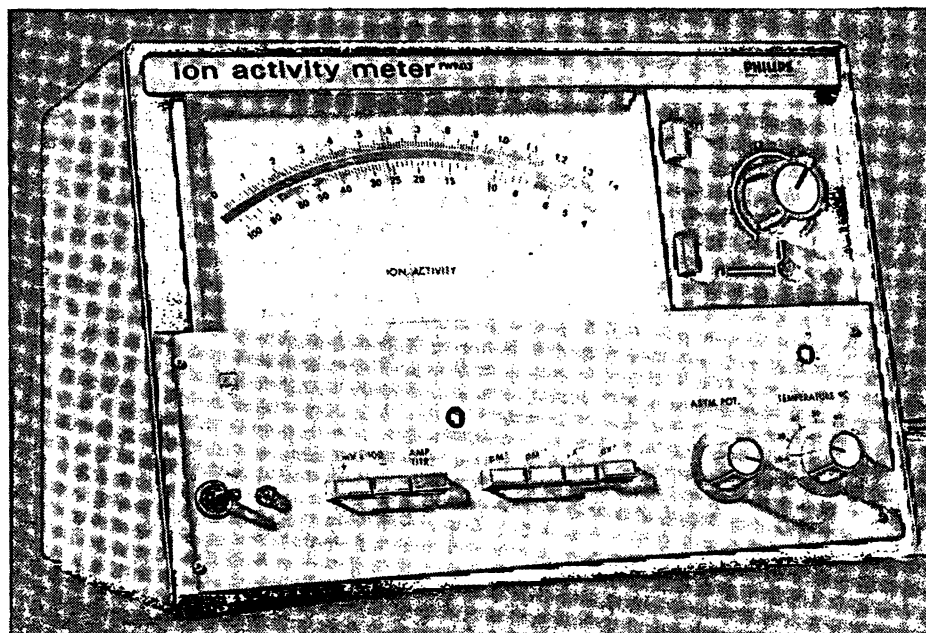
Die genauen Reaktionsbedingungen wie pH, Temperatur und Konzentration des Reagenz sind daher für die Ausbeute von großer Bedeutung. Als günstigste Bedingung erwies sich die Verwendung einer gesättigten 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Lösung in 5N HCl, was im Urin pH 2,5 bis 3 ergibt. Die Abhängigkeit von Zeit und Temperatur ist in Abbildung 2 dargestellt. Die Hydrierung der 2,4-Dinitrophenylhydrazone erfolgt nach folgendem Reaktionsschema:

ionenselektiv messen ist einfach und bietet viele neue Möglichkeiten

Heute schon ist es in vielen Labors wünschenswert, Ionenaktivitäten messen zu können. Dafür stehen universelle Geräte zur Verfügung, die den höheren Anforderungen gerecht werden — für alle lieferbaren ionenselektiven Elektroden, z. B. zur Messung von pCl^- , pCN^- , pCa^{2+} und pNH_4^+ -Werten. Selbstverständlich lassen sich damit auch pH-Werte und Redoxpotentiale messen. Außerdem — und das ist interessant — sind diese Geräte zusätzlich für amperometrische Titrations eingerichtet. Der finanzielle Aufwand ist gering, der Zuwachs an Anwendungsmöglichkeiten und Flexibilität dagegen erfreulich hoch.

Das Ionenaktivitäts-Meßgerät PW 9413 für ionenspezifische Messungen in Industrie und Forschung, z. B. bei der Wasser- und Abwasserüberwachung und -untersuchung — dabei sind kontinuierliche Kontrollmessungen möglich — und

Sogar bei amperometrischen Titrations genügt ein Knopfdruck. Das Meßgerät zeigt dann den Strom in μA an — direkt geeignet für Karl Fischer Titrations. Die Gleichspannung ist einstellbar zwischen 0 und 100 mV.



in der klinischen Chemie, z. B. bei der Blut-, Serum-, Speichel- und Harnuntersuchung.

Das Gerät hat eine hohe Empfindlichkeit Dabei ist die Ablesegenauigkeit auf der 190 mm langen Skala bereits ungewöhnlich gut; sie läßt sich durch Bereichspreizung noch vergrößern.

... und eine hohe Stabilität

Dafür sorgt der Brückeneingang mit Varaktordioden.

Die Bedienung ist einfach

Die Bedienungselemente sind übersichtlich angeordnet. Das macht die Arbeit leicht und bequem.

Ein Knopfdruck genügt,

um ein- oder zweiwertige Anionen und Kationen vorzuwählen. Die Ionenaktivität bzw. -konzentration wird dann direkt auf dem Meßgerät abgelesen.

ionenselektive Elektroden

Philips bietet ein gut sortiertes Programm an Elektroden mit hoher Selektivität, hoher Empfindlichkeit und hoher Stabilität

mit Festkörpermembran

Chlorid, Bromid, Jodid, Cyanid, Sulfid, Fluorid, Silber, Cadmium

mit Flüssigmembran

Kalium, Ammonium, Calcium

mit Glasmembran

Kalium, Natrium — auch Einstab-Meßketten

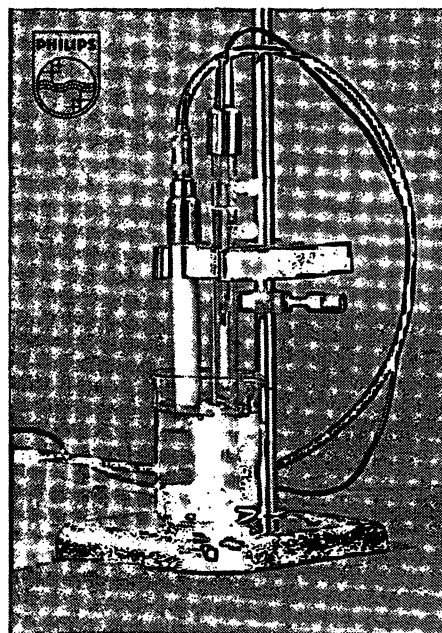
Referenzelektroden

mit Elektrolytbrücke, speziell für Messung mit ionenselektiven Elektroden

Weitere Elektroden, z. B. für Schwermetalle, sind in Vorbereitung

zur weiteren Information

schickt Ihnen Philips gern ausführliches Informationsmaterial. Bitte fordern Sie es an.



normierter Stromausgang

Neben dem Spannungsausgang 0...140 mV steht ein normierter Stromausgang 0...20 mA zur Verfügung, der vom Eingang galvanisch getrennt ist und zur Ansteuerung von Folgegeräten, wie z. B. Reglern und Schreibern dient.

Meßbereich normal: 0...14 p-Einheiten, bzw. 0... ± 1400 mV; gespreizt: 1,4 p-Einheiten, bzw. ± 140 mV, in 14 Stufen um jeweils eine p-Einheit bzw. 100 mV
Eingangswiderstand 10^{13} Ohm bei 25 °C
Asymmetriepotential-Einstellung: -300...+300 mV

Steilheitskorrektur: 54,0...59,2 mV für einwertige und 27,0...29,6 mV für zweiwertige Ionen

Temperaturkompensation von Hand oder automatisch mit Pt 100 Ohm Widerstandsthermometer

Reproduzierbarkeit $\pm 0,2\%$ vom Skalendwert

Philips Elektronik Industrie GmbH
2000 Hamburg 63, Röntgenstraße 22
Telefon (0411) 58 01 31

Telefon-Nummern der Büros in: Berlin (0311) 24 59 68, Bielefeld (0521) 2 30 81-87, Dortmund (0231) 4 19 61, Düsseldorf (0211) 34 60 51/55, Frankfurt (0611) 7 91 31, Hamburg (0411) 50 10 31, Hannover (0511) 1 66 01, Kiel (0431) 73 23 66, Köln (0221) 51 42 60, Mannheim (0621) 4 20 16-18, München (0811) 7 67 91, Nürnberg (0911) 46 47 63, Stuttgart (0711) 58 90 81-83.

in Österreich: Österreichische Philips Industrie GmbH, Wien, Triester Str. 64

in der Schweiz: Philips AG, Zürich, Postfach, Tel.: (051) 44 22 11

PHILIPS

A 151.7

Wir interessieren uns für das Meßgerät PW 9413 und für ionenselektive Elektroden und bitten um

☐ Zusendung ausführlicher Unterlagen

☐ ein Angebot:

Gewünschtes bitte ankreuzen oder ergänzen



Um von etwas anderem zu reden..

Wir nehmen an Charles River COBS®-Ratten alle chirurgischen Veränderungen vor, die Ihren Laborzwecken entsprechen.

Wir führen Thyroidektomien, Hypophysektomien und vier weitere Endokrinektomien aus, auch Thymektomien an neugeborenen Rattenjungen. Wir können jede einzelne dieser verschiedenen chirurgischen Veränderungen, oder auch jede beliebige Kombination an jedem von Ihnen bestimmten Tier vornehmen.

Alle Mitglieder des chirurgischen Teams bei Charles River France sind Biologen, die die erforderlichen Eingriffe in schonenden Verfahren so umfassend und vollständig durchzuführen verstehen, daß die Tiere für Versuche optimal geeignet sind.

Wenn Sie chirurgisch veränderte Tiere benötigen, teilen Sie uns bitte Ihre entsprechenden Wünsche mit.

Was an Charles River Ratten zu machen ist, können Sie uns anvertrauen.

Charles River France 
76 Saint-Aubin-Lès-Elbeuf, France

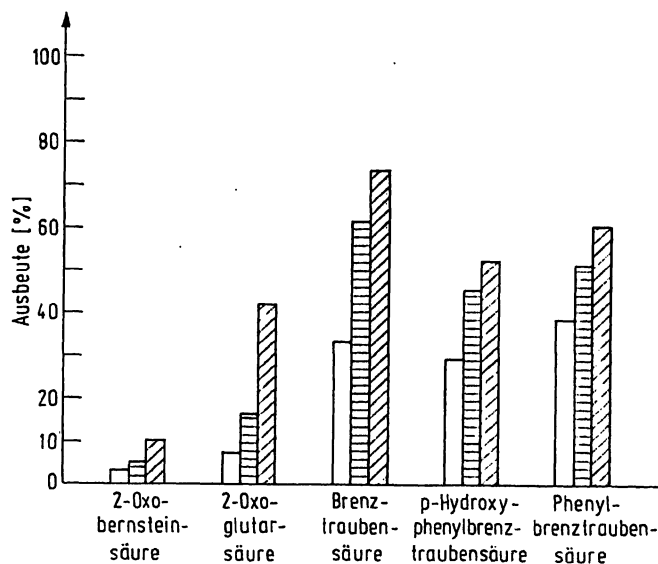
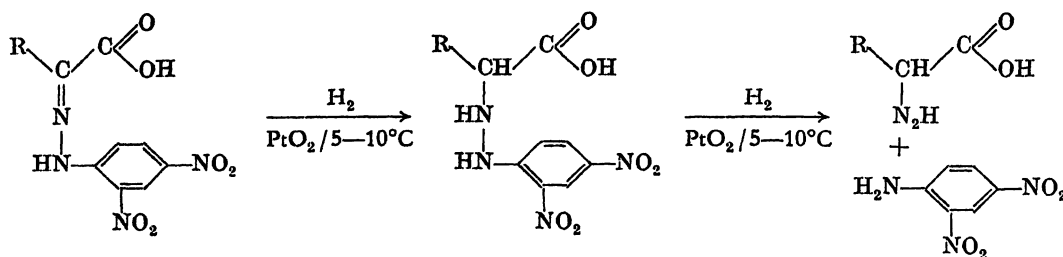


Abb. 2

Diagramm der Gesamtausbeuten bei verschiedenen Reaktionsbedingungen für die Hydrazonbildung bei pH 2,5 (weiße Säulen: 30 Min. bei 40°, horizontal schraffierte Säulen: 12 Stdn. bei 24°, schräg schraffierte Säulen: 12 Stdn. bei 4°); Hydrierung bei pH 7 und 15°

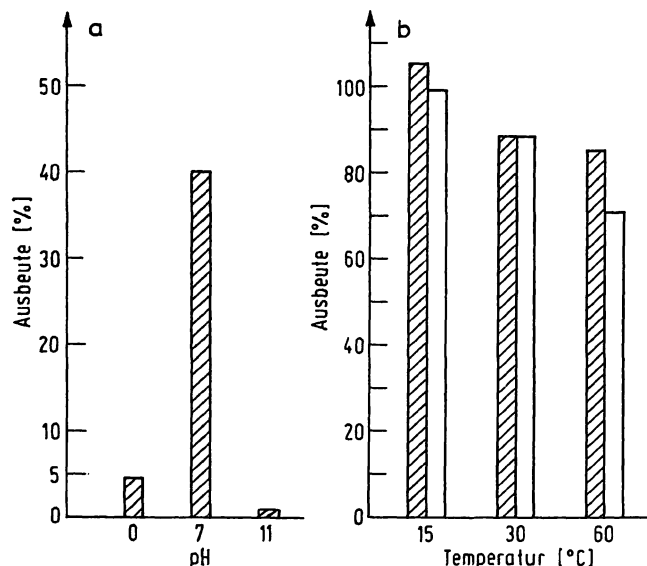


Abb. 3

Diagramm der Ausbeuten der katalytischen Reduktion bei verschiedenen Reaktionsbedingungen

a) *p*-Hydroxyphenylbrenztraubensäure bei 20°
b) Brenztraubensäure (schraffiert) und 2-Oxoglutarinsäure (weiß) bei pH 7

Wir haben die Hydrierung in verschiedenen Lösungsmitteln, bei verschiedenem pH und unter verschiedenen Hydrierungsbedingungen überprüft. Die katalytische Hydrierung in Äthanol eignet sich besser als diejenige in Wasser (12). Hydrierungsversuche bei unterschiedlichem pH (alkalisch, sauer und neutral) ergaben die besten Ausbeuten bei einem pH-Wert von 6,5 bis 7,5. Die von TOWERS, THOMPSON und STEWARD verwendete Hydrierungsmethode mittels einer Apparatur nach PARR benötigt bis zur Beendigung der Reaktion Hydrierungszeiten bis zu 12 Stdn. bei Raumtemperatur. Hierbei können in erheblichem Maße Nebenreaktionen ablaufen. Beim Durchleiten von Wasserstoff durch die Lösung in der Kälte ist die Hydrierung bereits nach 20 bis 30 Min. beendet, und es werden daher weniger Zersetzungsprodukte gebildet. Ein Vergleich der Hydrierung bei verschiedenen Temperaturen ergab die besten Bedingungen bei 5 bis 10°. In Abbildung 3 ist die Abhängigkeit der Hydrierung von pH und Temperatur dargestellt.

Die elektrolytische Hydrierung nach SMITH (11) wurde von uns ebenfalls getestet. Wir benutzten dazu eine Apparatur mit einer semipermeablen Membran und zwei Platinelektroden (Durchfluß).

Es ergaben sich hierbei apparative Schwierigkeiten (Wärmeentwicklung) und Probleme der pH-Einstellung. Für die elektrolytische Reduktion benötigen wir

Protonen, andererseits begünstigt ein saures pH die Decarbonylierung.

In Tabelle 1 sind Ausbeute und Variationskoeffizient von 10 Parallelbestimmungen elf verschiedener Oxosäuren dargestellt. Die Oxosäuren wurden jeweils vor Beginn der Analyse dem Urin beigemischt.

Tab. 1

Wiederauffindungs- und Reproduzierbarkeits-Versuche von 11 dem Urin zugemischten Oxosäuren (jeweils 12 Parallelbestimmungen)

| Testsubstanz (Oxosäure) | Bestimmung als Aminosäure | Ausbeute (%) | Variationskoeffizient (%) |
|--|------------------------------------|--------------|---------------------------|
| Brenztraubensäure | Alanin | 79,1 ± 9,5 | 12,0 |
| Phenylbrenztraubensäure | Phenylalanin | 50,0 ± 8,0 | 16,1 |
| <i>p</i> -Hydroxyphenylbrenztraubensäure | Tyrosin | 43,0 ± 7,2 | 16,6 |
| 2-Oxo-glutarsäure | Glutaminsäure | 48,8 ± 8,5 | 17,3 |
| Glyoxylsäure | Glycin | 30,8 ± 5,9 | 19,0 |
| 2-Oxo-buttersäure | α -Amino-buttersäure | 57,3 ± 8,6 | 15,1 |
| 2-Oxo-isovaleriansäure | Valin | 58,2 ± 4,9 | 8,3 |
| 2-Oxo-3-methylvaleriansäure | Isoleucin + <i>allo</i> -Isoleucin | 56,2 ± 7,1 | 12,5 |
| 2-Oxo-isocaproinsäure | Leucin | 68,1 ± 9,8 | 14,4 |
| 2-Oxo-capronsäure | Norleucin | 56,1 ± 8,6 | 15,2 |
| 2-Oxo-bernsteinsäure ¹⁾ | Asparaginsäure | 11,7 ± 3,9 | 26,3 |

¹⁾ decarboxyliert sehr leicht

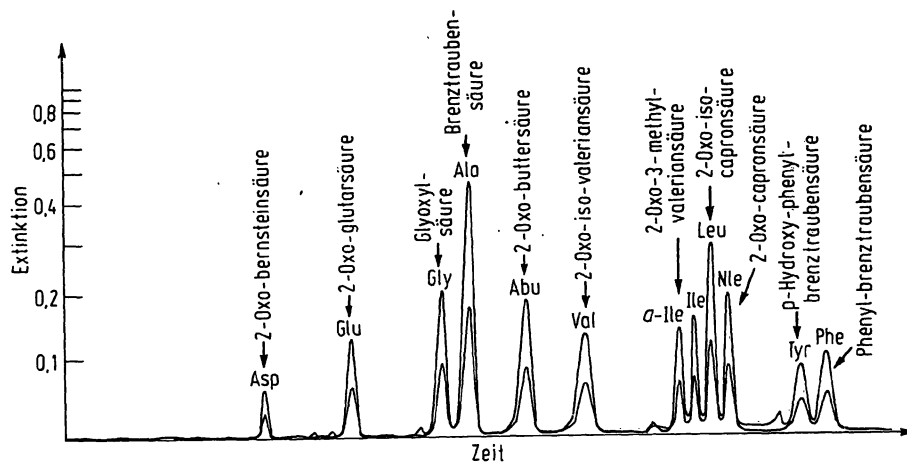


Abb. 4
Chromatogramm einer Testmischung aus
11 dem Urin zugemischten Oxosäuren

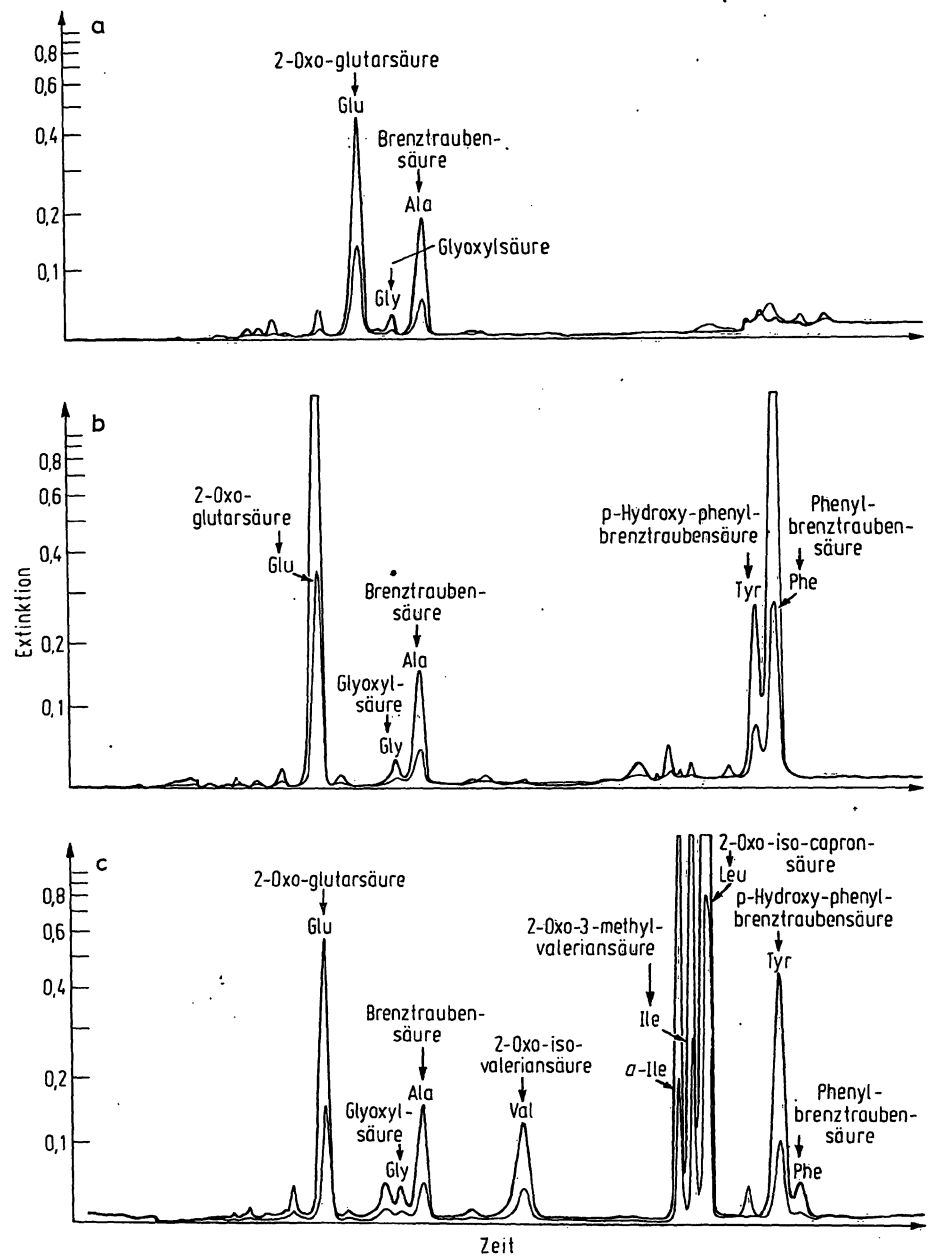


Abb. 5
Chromatogramm eines gesunden Probanden
(a) eines Patienten mit Phenylketonurie
(b) und eines Patienten mit Leucinose (c)

In Abbildung 4 ist ein entsprechendes Aminosäuren-Chromatogramm dargestellt.

Abbildung 5 zeigt das Chromatogramm eines Gesunden, eines Patienten mit Phenylketonurie und eines Patienten mit Leucinose.

Diskussion

Bei der Bildung der Phenylhydrazone sind die 2,4-Dinitrophenylhydrazone die geeignetsten Derivate. Die Zugabe einer gesättigten Lösung von 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 5N HCl und eine 10- bis 15 stdg. Inkubation in der Kälte erwiesen sich als die besten Reaktionsbedingungen. Die Hydrierung in Äthanol ist derjenigen in Wasser überlegen. Beim Durchleiten von Wasserstoff bei 5 bis 10° kann die Reaktionszeit auf 20 bis 30 Min. beschränkt und damit die Entstehung von Nebenprodukten weitgehend vermieden werden. Die Übersichtung des teuren sphärischen Aminosäuren-Harzes mit gewöhnlichem Kationenaustauscher verhindert die Kontamination der Säule, und es wird dadurch die quantitative Aminosäuren-Analyse mit

einem der üblichen Analysatoren möglich. Daß die Ausbeuten nicht noch höher sind, ist im wesentlichen auf die Phenylhydrazonbildung zurückzuführen. Die katalytische Hydrierung verläuft nahezu quantitativ. Mit Hilfe der so abgeänderten Methode können praktisch alle Oxosäuren mit relativ guter Ausbeute und hoher Empfindlichkeit und Spezifität bestimmt werden. Allerdings weist die Oxalessigsäure aufgrund ihrer leichten Decarboxylierbarkeit eine sehr geringe Ausbeute auf. Der Arbeitsaufwand der Methode ist relativ klein. Limitierender Faktor ist lediglich die Aminosäuren-Analyse, wobei jedoch bei Beschränkung auf einige bestimmte Oxosäuren mit Hilfe von Aminosäuren-Kurzprogrammen (13–15) die Analysendauer wesentlich reduziert werden kann.

Literatur

1. CAVALLINI, D., N. FRONTALI und G. TOSCHI, *Nature London* 163, 568 (1949). — 2. COWARD, R. F. und P. SMITH, *J. Chromatog.* 33, 508 (1968). — 3. BERLET, H. H., *Analytic. Biochem.* 22, 525 (1968). — 4. LUTZ, P. und G. M. v. REUTERN, *diese Z.* 7, 586 (1969). — 5. HORNING, E. C. und M. G. HORNING, *J. Chromatog. Sci.* 9, 129 (1971). — 6. HOFFMAN, N. E., K. M. GOODING, K. M. SHEAHAN und C. A. TYLEND, *Research Communications in: Chem. Pathol. Pharmacol.* 2, 87 (1971). — 7. KESNER, L. und E. MUNTWYLER, *Analytic. Chem.* 38, 1164 (1966). — 8. RONKAINEN, P., *J. Chromatog.* 28, 263 (1967). — 9. TOWERS, G. H. N., F. C. STEWARD, und J. F. THOMPSON, *J. Amer. chem. Soc.* 76,

2392 (1954). — 10. MEISTER, A. und P. A. ABENDSCHEIN, *Analytic. Chem.* 28, 171 (1956). — 11. SMITH, I. in: *Chromatographic and Electrophoretic Techniques*, Vol. 1, William Heinemann Medical Books Ltd., London (1969). — 12. GROB, C. A., in: *Synthetische Methoden der organischen Chemie*, Verband Basler Chemiestudierender, 1959. — 13. BENSON, J. V., J. CORMIK und J. A. PATTERSON, *Analytic. Biochem.* 18, 481 (1967). — 14. SHIH, V. E., M. L. EFRON und G. L. MECHANIC, *Analytic. Biochem.* 20, 299 (1967). — 15. HAMILTON, P. B., in: *Handbook of Biochemistry, Selected Data for Molecular Biology*, S. B-43-B-55 (Editor: H. A. Sober), The Chemical Rubber Co., Cleveland, Ohio (1968).

Priv.-Doz. Dr. H.-Ch. Curtius
Steinwiesstr. 75
CH-8032 Zürich